

Université de Sherbrooke

Induction de gènes viraux
chez des cellules de rat
transformées par l'adénovirus 2

par

Raymond Tellier

Département de microbiologie

Thèse présentée à la Faculté de
Médecine en vue de l'obtention
du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

© Raymond Tellier

23/07/85

LIVRES
RARES

Permission has been granted to the National Library of Canada to microfilm this thesis and to lend or sell copies of the film.

The author (copyright owner) has reserved other publication rights, and neither the thesis nor extensive extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her written permission.

L'autorisation a été accordée à la Bibliothèque nationale du Canada de microfilmer cette thèse et de prêter ou de vendre des exemplaires du film.

L'auteur (titulaire du droit d'auteur) se réserve les autres droits de publication; ni la thèse ni de longs extraits de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation écrite.

ISBN 0-315-33477-0

SOMMAIRE

Dans ce mémoire nous nous intéressons à l'expression des gènes de l'adénovirus type 2 dans des cellules de rat transformées par ce même adénovirus (lignée F-4). On sait qu'une partie seulement des gènes viraux intégrés sont exprimés; la présente recherche vise à induire l'expression de la région L-1 (normalement dormante) à l'aide d'un traitement à la 5 - azacytidine; ce travail s'inscrit donc dans le paradigme de la méthylation de l'ADN.

L'expression des gènes est vérifié par hybridation de l'ARN cytoplasmique total avec les sondes appropriées. La méthylation de l'ADN est vérifiée par digestion par des enzymes de restriction idoines, suivi d'une hybridation avec les sondes appropriées.

REMERCIEMENTS

Mener à terme un projet de recherche exige toujours, en plus des efforts de l'auteur, l'aide et la collaboration de plusieurs personnes, et c'est un plaisir pour moi de souligner ici le rôle de ces personnes.

Des remerciements particuliers vont au Dr. Joseph Weber, mon directeur de thèse, qui a droit à toute ma gratitude et à mon admiration pour avoir su maintenir dans son laboratoire une ambiance de haute qualité, tant sur le plan scientifique qu'humain.

Le Dr. Claude Déry et le Dr. Joseph Horvath ont su faire preuve d'une grande patience face aux gaffes d'un débutant, et n'ont pas mesuré leur aide et leurs conseils lors de mon travail expérimental; qu'ils en soient ici remerciés.

Tous les membres du laboratoire ont contribué, par leur attitude chaleureuse, à rendre très agréable le travail expérimental. De plus, Normand Robert doit être particulièrement remercié pour son don de sondes clonées dans M-13. Enfin, il faut souligner ici l'atmosphère dynamique et amicale du département de microbiologie.

Il me fait plaisir de noter le soutien financier de l'Institut National du Cancer du Canada au cours de ce travail, par le biais d'une bourse Terry Fox.

Mme Raymonde Després s'est acquittée avec brio de la dactylographie du manuscrit.

Mlle Cynthia Stolowitz a exécuté, avec son talent habituel, les diagrammes de la section "Matériel et méthodes".

Enfin, Mlle Marie Bédard et M. René Barette ont bien voulu participer à la correction des épreuves.

TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE.....	i
REMERCIEMENTS.....	ii
TABLE DES MATIERES.....	iii
LISTE DES FIGURES.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	v
LISTE DES ABREVIATIONS.....	vi
INTRODUCTION.....	1
MATERIEL ET METHODES.....	12
RESULTATS.....	26
DISCUSSION.....	39
CONCLUSIONS.....	42
BIBLIOGRAPHIE.....	43

LISTE DES FIGURES

1.	5 - azacytidine.....	p. 4
2.	Génome d'Ad2 dans les cellules F-4.....	p. 9
3.	Messagers exprimés dans les cellules transformées par l'adénovirus.....	p. 10
4.	"Southern-Blot".....	p. 20
5.	Sondes simple-brin: principe.....	p. 22
6.	Sondes simple-brin: principe.....	p. 22
7.	Induction de la région L 1.....	p. 27
8.	ARN extrait des clones.....	p. 29
9.	Expression augmentée de E 1.....	p. 31
10.	Induction de l'expression de L 1 chez certains clones.....	p. 32
11.	Parité de l'induction.....	p. 33
12.	Clonage simple, sans traitement.....	p. 35
13.	Méthylation de la région codante de L 1.....	p. 37
14.	Méthylation de la région du promoteur.....	p. 38

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1.....	p. 34
----------------	-------

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
BSA	Bovine serum albumine
DMEM	Dulbecco modified essential media
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylenediamine tetraacetate Acid disodium salt
NP40	Nonidet P 40
NTB	Nick translation buffer
PBS A	Phosphate Buffer Saline - A
PVP	Polyvinyl pyrrolinone
RSB	Reticulocyte standard buffer
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TE	Tris EDTA
Tris	Tris hydroxy methyl amino méthane
VRC	Vanadyl ribonucleotide complex

INTRODUCTION

Le présent travail s'intéresse à l'étude de l'expression des gènes viraux dans des cellules transformées par l'adénovirus; on sait que les mécanismes de contrôle de l'expression génétique exercent un immense attrait, tant pour des raisons théoriques que cliniques: en effet, non seulement l'élucidation de ces mécanismes est essentielle à notre compréhension de la cellule, mais de nombreuses situations cliniques mettent en jeu, semble-t-il, le contrôle de l'expression génétique; en particulier les relations entre cancer et expression génétique semblent étroites (Riggs, 1983).

Face à ce problème, l'étude des gènes viraux dans une cellule transformée constitue un modèle précieux, puisque le système génétique des adénovirus (par exemple) est beaucoup plus simple et bien mieux connu que le système génétique d'une cellule de mammifère. De plus, nous disposons de toutes les sondes requises pour les expériences d'hybridation.

Parmi les divers mécanismes de contrôle de l'expression génétique il en est un qui a attiré particulièrement l'attention ces dernières années, et qui a été le point de départ de la recherche décrite dans ce mémoire: il s'agit de la méthylation de l'ADN. Cette notion, et quelques autres nécessaires à la compréhension de ce travail, sont présentées dans les pages qui suivent.

Définition

Par méthylation de l'ADN nous désignons spécifiquement l'incorporation de la base 5 - méthyl cytosine dans la molécule d'ADN, en lieu et place de la cytosine.

La 5 - méthyl cytosine est la "base rare" la plus fréquente (et de loin) retrouvée dans l'ADN eucaryotique; plusieurs évidences expérimentales (Doerfler, 1983; Riggs, 1983) montrent que les génomes eucaryotiques possèdent un patron spécifique de méthylation et que ce patron est transmis aux molécules-filles lors de la réplication de l'ADN.

Biochimie

Les 5 - méthyl cytosines de l'ADN eucaryotique se retrouvent surtout dans les séquences CpG (Doerfler, 1983); de plus, 70% environ des séquences CpG sont méthylées dans l'ADN des cellules animales (Doerfler, 1983). Il est intéressant de noter que les séquences CpG sont statistiquement sous-représentées dans l'ADN animal (Doerfler, 1983; Bird, 1980; Max, 1984); une explication de ce phénomène serait la suivante: on sait que la cytosine peut subir spontanément une déamination pour se transformer en uracil, qui est alors excisé de l'ADN; une telle déamination transformerait la 5-méthyl cytosine en thymine. Or l'on démontre (Bird 1980) que la sous-représentation du doublet CpG est corrélée avec la sur-représentation du doublet TpG; cette instabilité, soit fait partie des fonctions de la 5-méthyl cytosine (fonction évolutive par génération spontanée de

mutations?) soit constitue un inconvénient, balancé par d'autres avantages de la 5-méthyl cytosine; le débat reste ouvert (Bird, 1980; Max, 1984).

Incidentement, les doublets CpG nous permettent d'utiliser une méthode simple d'estimer le degré de méthylation de l'ADN, soit l'usage de la paire isoschizomérique HPA-II et MSP-I: ces deux enzymes de restriction reconnaissent la séquence CC↓GG, mais HPA-II ne coupera pas si la deuxième C est méthylée; une différence des patrons de digestion par HPA-II et MSP-I est donc attribuable à la méthylation. D'autres méthodes, plus précises mais plus laborieuses, existent (Doerfler 1983).

La 5 - méthyl cytosine provient de la méthylation d'une cytosine déjà incorporée dans la molécule d'ADN, méthylation accomplie par des enzymes: les méthylases. On distingue:

1) les méthylases d'entretien, qui agissent sur l'ADN hémiméthylé (v.g. tel qu'obtenu immédiatement après réplication), reconnaissent un doublet 5-mCpG et méthylent la cytosine du doublet CpG complémentaire. De tels enzymes ont été isolés chez des eucaryotes et sont responsables de la transmission héréditaire du patron de méthylation (Doerfler, 1983).

2) les méthylases de novo, capables de méthyliser une molécule d'ADN sans patron préalable. Les méthylases des systèmes de restriction-transformation procaryotiques appartiennent à cette catégorie, mais on a mis en évidence de tels enzymes chez les eucaryotes (Doerfler 1983).

Le groupement méthyl utilisé par ces enzymes provient du S - adénosyl méthionine (Ado Met), un dérivé de la méthionine (Doerfler 1983; Hoffman 1984).

Notons également qu'une activité de déméthylation de l'ADN a été établie chez des systèmes eucaryotiques, possible-ment dues à des déméthylases (Doerfler, 1983).

Fonction

On suppose actuellement que la méthylation est un méca-nisme de régulation de l'expression de l'ADN, en effet:

1) de façon générale dans les cellules animales les gènes réprimés sont hyperméthylés, les gènes exprimés sont hypométhylés; ainsi les patrons de méthylation chez un animal sont différents d'un tissu à l'autre (Doerfler, 1983).

2) des expériences de transcription dans des oocytes de *Xenopus Laevis* montrent que la méthylation préalable de l'ADN en bloque la transcription (Doerfler, 1983).

3) Il est possible d'induire une hypométhylation du gé-nôme par un traitement à la 5 - azacytidine, un analogue de la cytosine ayant un azote substitué au carbone en position 5.

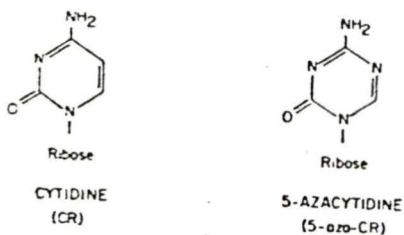


Fig. 1

La 5-azacytidine est incorporée dans l'ADN et non seulement ne peut être méthylée mais, étant donné le mécanisme des méthylases ("Walking enzyme"), bloque l'enzyme sur place et induit donc une hypométhylation extensive (Doerfler, 1983). Une telle hypométhylation est dans plusieurs cas associée à l'expression de gènes auparavant réprimés, pouvant aller jusqu'à la différenciation de cellules embryonnaires (v.g. en myocyte) (Doerfler, 1983). De plus, l'hypométhylation étant transmise lors de la duplication de l'ADN, une telle induction peut simuler une mutation. Cependant la corrélation négative entre méthylation et expression n'est pas parfaite, et l'hypothèse consensuelle actuelle est:

1) le degré de méthylation de sites spécifiques (promoteurs) joue un rôle important dans la régulation de l'expression de l'ADN (Kruczek et al., 1983; Langmer et al., 1984).

2) la méthylation est un mécanisme de verrouillage du gène; mais de même qu'une porte déverrouillée n'est pas nécessairement ouverte, un gène hypométhylé n'est pas nécessairement exprimé (Doerfler, 1983).

Mécanisme d'action de la méthylation

Il n'est pas connu avec certitude; il semble que ce soit la méthylation de la région du promoteur qui empêche l'initiation de la transcription (Kruczek et al., 1983; Doerfler, 1983; Langmer et al., 1984); cependant une molécule d'ADN méthylée peut être transcrite dans un système in vitro: le

mécanisme n'est donc pas une simple inhibition de l'ARN - polymérase par la 5- méthyl cytosine (Jove et Sperker, 1984). On suppose donc comme mécanisme une altération de la structure de la chromatine (Doerfler, 1983; Morgenegg et al., 1983). Il est intrigant de noter qu'une molécule de poly d5-mCdG peut adopter la conformation Z à des concentrations salines physiologiques (Doerfler, 1983; Hoffman, 1984; Jove et Sperker, 1984). Etant donné le fait que l'on retrouve la configuration Z in vivo (Morgenegg et al., 1983) il est tentant de supposer que la méthylation agisse en favorisant la configuration Z des promoteurs. Il est de plus fort possible, comme l'a souligné Doerfler, que l'on doive faire appel à la notion de codage de type idéogramme, superposé au codage linéaire de l'ADN, pour comprendre les signaux de la méthylation (Doerfler, 1982 (2)).

Méthylation et cancer

Le cancer peut être décrit comme une conséquence d'une régulation anormale de l'expression des gènes; il est donc logique de se demander si la méthylation y joue un rôle. En effet, un mécanisme possible d'activation d'un oncogène cellulaire pourrait être l'hypométhylation.

Plusieurs évidences expérimentales suggèrent que ce pourrait être le cas pour une fraction notable des cancers: c'est ainsi que l'on a mis en évidence, chez certaines cellules cancéreuses, des anomalies du métabolisme de la méthionine

(Hoffman, 1984), de la méthylation des acides nucléiques (Brière, 1971; Gama-Losa et al., 1983; Goelz et al., 1985). Enfin plusieurs substances pouvant théoriquement altérer les mécanismes de méthylation sont effectivement des carcinogènes (Hoffman, 1984), y compris la 5-azacytidine (Jove et Sperker, 1984; Harrison et al., 1983).

Concernant les oncogènes viraux, le problème est quelque peu différent: on sait que chez les virus à ADN, les oncogènes figurent parmi les gènes précoces, et les fonctions lytiques parmi les gènes tardifs; pour une transformation virale il faut donc que l'expression des gènes tardifs soit absente; un des mécanismes possibles pourrait être la méthylation des gènes tardifs. Chez certaines lignées cellulaires transformées par l'adénovirus on peut mettre en évidence un patron de méthylation du génome viral (Doerfler 1982 (1)); naturellement il y a corrélation entre maintien de la transformation et hypométhylation des oncogènes viraux (Doerfler, 1982 (1), Hoffman, 1984) mais pas nécessairement hypométhylation de tout le génome (Wettstein et Stevens, 1983). On peut d'ailleurs produire des révertants en méthylant les oncogènes viraux (Sauer et al. 1984).

5 - azacytidine

Comme nous l'avons déjà mentionné ce composé peut induire une hypométhylation extensive en bloquant sur place les méthylases; on sait que ce composé est aussi un mutagène (Harrison et al., 1983) et un cancérigène (Hoffman, 1984). A hautes doses la 5 - azacytidine inhibe la synthèse des protéines, de l'ADN et de l'ARN (Jones et Taylor, 1980). De plus des études récentes montrent qu'une exposition transitoire d'*Aspergillus* à la 5 - azacytidine suffit à induire chez une large fraction de la population des changements bien précis, héréditaires; la constance du type de changement induit est incompatible avec un effet mutagénique. Or, le génome des *Aspergillus* ne contenant pas de 5 méthyl cytosine à un niveau détectable on ne peut a priori attribuer cet effet de la 5-azacytidine à l'Hypométhylation (Tamame et al., 1983 (1); Tamame et al., 1983 (2)).

Enfin, mentionnons brièvement un essai de thérapeutique médicale utilisant la 5-azacytidine: le traitement de la β -thalassémie. Dans cette maladie, l'accumulation de globines α non conjuguée à des globines β entraîne une survie beaucoup plus courte du globule rouge; un traitement à la 5-azacytidine provoque par hypométhylation du gène de la globine γ une expression de ce gène, la fabrication de globine γ et d'hémoglobine foetale ($\alpha_2\gamma_2$), augmentant ainsi la survie du globule rouge. Tous ces phénomènes sont cependant transitoires (Ley et al., 1982).

Cellules F-4

On sait que l'adénovirus est un virus oncogène; les cellules transformées contiennent des parties variables du génome viral, et expriment de façon variable les ARNm de l'adénovirus; une seule constante demeure: pour qu'il y ait transformation par l'adénovirus, la région E1 doit être insérée dans le génome cellulaire, et les gènes E1a et E1b exprimés. Nous nous intéresserons en particulier aux cellules F-4, cellules transformées par l'adénovirus type 2 et dont un schéma de l'intégration virale suit:

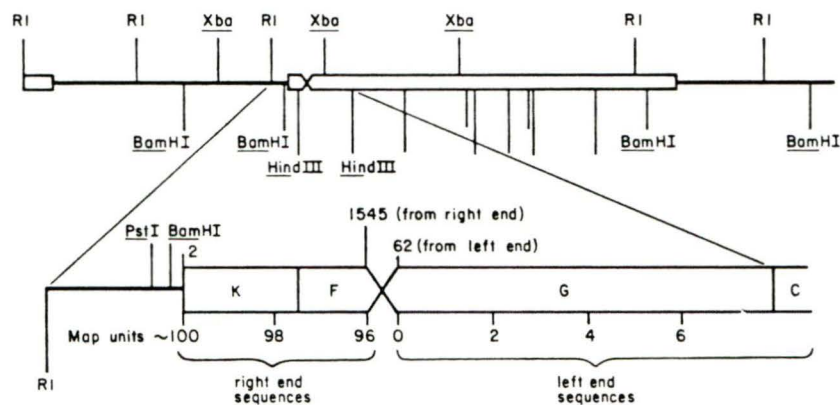


Fig.2

Les cellules F-4 contiennent donc un tandem formé des 4% finaux du génome, en tête à queue, suivi des 60% initiaux du génome; ce tandem est présent en 16 copies dans le génome cellulaire, ce qui rend ces cellules particulièrement propices à des études par hybridation avec des sondes d'adénovirus 2.

La figure 3 compare l'expression des messagers de l'adénovirus 2 chez diverses lignées de cellules transformées: on constate notamment que la région L1 n'est transcrite dans aucune lignée.

La carte de restriction du génome pour les Enzymes Hind III et Bgl II est également illustrée à la figure 3.

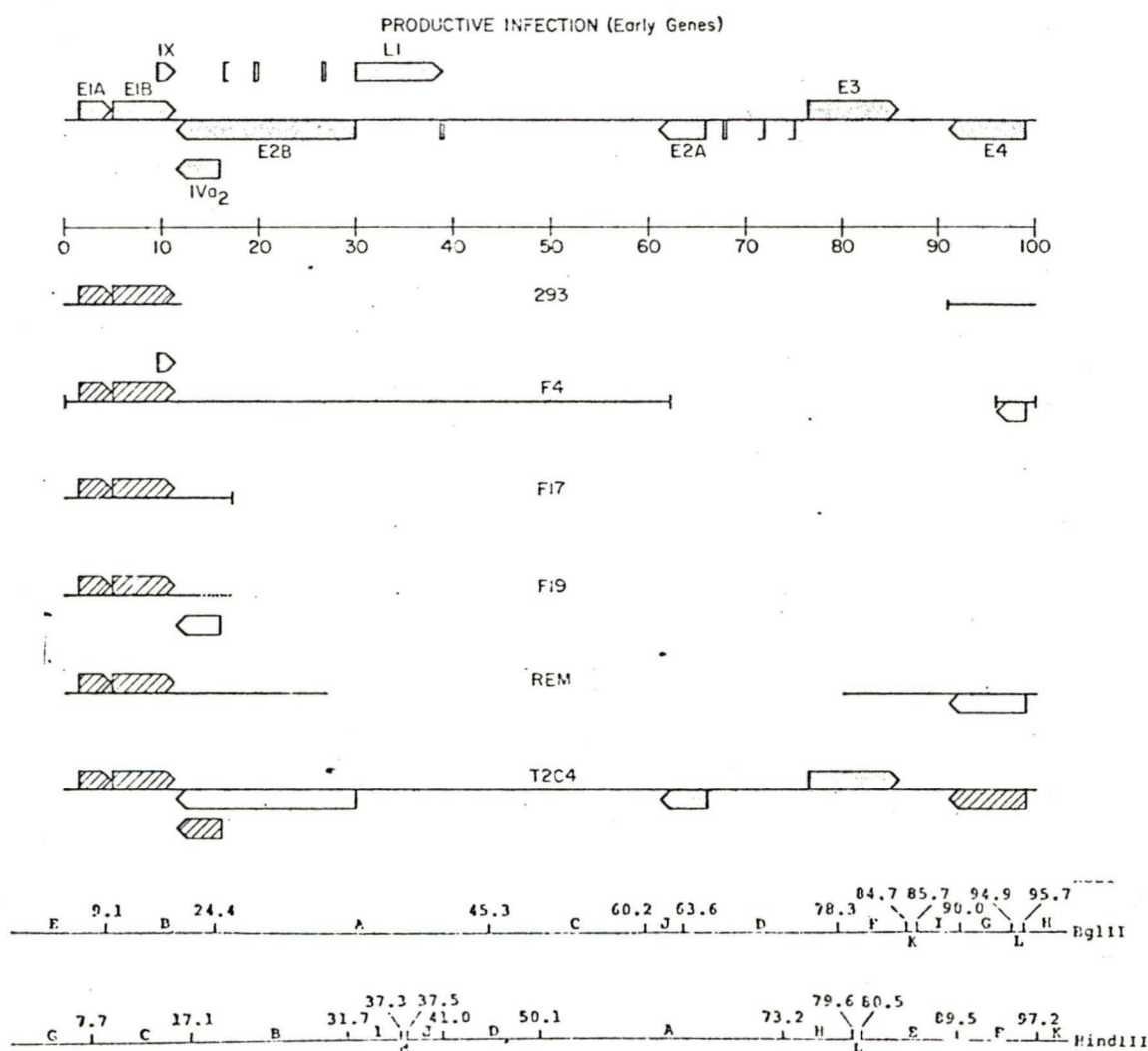


Fig. 3

Problème étudié dans ce mémoire

Nous nous sommes intéressés au fait que la région L1 n'est pas exprimée dans les cellules F-4; on peut s'interroger sur les mécanismes de cette répression. Au moins deux hypothèses peuvent être évoquées pour expliquer ce phénomène:

i) la région L1, et/ou son promoteur, est méthylée. On sait que des situations de ce genre existent chez certaines lignées cellulaires transformées par l'adénovirus (Doerfler, 1982 (1)).

ii) la région tardive contient les fonctions lytiques du virus (Tooze, 1982) et on peut supposer que l'expression des gènes tardifs entraînerait la lyse des cellules transformées; il s'opérerait alors, au sein de la population cellulaire, une sélection contre les cellules exprimant les fonctions tardives (à moins qu'il y ait transcription sans traduction ("translation")).

On peut également postuler une action "toxique" de gènes cellulaires inhibiteurs. Quoiqu'il en soit, au niveau expérimental deux questions se posent immédiatement:

i) la région L1 est-elle inductible?

ii) cette expression est-elle stable d'une génération à l'autre?

L'hypothèse d'un blocage de l'expression par la méthylation nous offre une façon de tenter l'induction: un traitement à la 5 azacytidine.

MATERIEL ET METHODES

Survol de l'expérience

Dans une première série d'expériences, des cellules F-4 furent cultivées en présence de 5 - azacytidine, puis mises en culture en l'absence de 5 - azacytidine; l'ARN (total) et l'ADN cellulaires furent prélevés pour analyses (voir les procédures plus loin) 1,2 et 3 jours après la fin de l'exposition à la 5 - azacytidine. Dans une 2^e série d'expérience des cellules F-4 furent cultivées en présence de 5 - azacytidine durant 30 jours, puis diluées à diverses concentrations et "sib clonées"; pour chaque lignée, le nombre de clones fut compté, les cellules amplifiées, l'ARN et l'ADN extraits et purifiés, et leur concentration respective déterminée. L'ARN fut déposé sur une membrane de nitro-cellulose (procédure de "dot blot") et hybridé avec diverses sondes provenant soit de la méthode de "nick-translation" soit à partir d'ADN simple brin obtenu par clonage dans le phage M-13. L'ADN fut digéré par les enzymes de restriction Hind III et Hpa II, migré sur gel d'agarose, coloré au bromure d'éthidium et photographié, puis dénaturé, transféré sur une membrane de nitro-cellulose (procédure de "Southern-Blot") et hybridé avec diverses sondes obtenues par "nick-translation".

Culture des cellules

Les cellules F-4 sont cultivées dans des assiettes de Pétri pour culture de cellules, en présence de milieu DMEM avec 10% de sérum de veau (Gibco) et de 5% à 10% d'amphotéricine B (fungizone). Dans la première série d'expérience, les cellules furent cultivées avec de la 5 - azacytidine dans le milieu, à des concentrations de 3 μ M/l ou de 10 μ M/l. Dans la deuxième série d'expériences les cellules furent cultivées 30 jours en présence de 5 - azacytidine 3 μ M/l. (Provenance de la 5- azacytidine: Sigma chemicals). Les cellules furent alors suspendues dans une solution de DMEM avec 20% de sérum de veau et 10% de glycérol, à une concentration de 1×10^6 /ml, tel qu'évalué à l'aide d'un hémacytomètre. Certaines fioles furent alors dégelées, et diluées (à l'aide de DMEM 10%) à des concentrations de 10 cellules /ml, 100 cellules/ml, 500 cellules/ml; 1 ml de cette suspension est alors ajouté à 1.5 ml de DMEM 10% dans des pétris de 3.5 mm x 10 mm. Après une semaine le nombre de clones est compté; on ne conserve que les sib-clones contenant moins de 100 clones, et la plupart en ont moins de 35.

Ces sib-clones sont alors transférés dans de grands pétris (100 mm x 15 mm) et incubés jusqu'à confluence.

Extraction de l'ARN et de l'ADN

L'ARN cytoplasmique et l'ADN nucléaires sont extraits selon le protocole suivant:

- Rincer 2 fois la couche cellulaire au fond du pétri avec de la solution PBS-A stérile (PBS-A: dans un litre de solution on a: NaCl 10 g, KCl 0.25 g, Na_2HPO_4 1.435 g, KH_2PO_4 0.25 g. Le Ph est ajusté à 6.8 avec du KH_2PO_4).

- Décoller mécaniquement les cellules avec un objet stérile, en présence de PBS-A.

- Recueillir la suspension cellulaire dans un tube Sorvall, centrifuger 15 min. à 1 000 tours/min.

- Se débarasser du surnageant, ajouter au culot 1 ml de la solution suivante: tampon RSB stérile (RSB: tris 10 mM (Ph>4), NaCl 10 mM, Mg Cl 3 mM) avec NP40 0.1%, VRC 10 mM. Le NP40 est un détergent, le VRC un inhibiteur des Rnases).

- Vortexer 3 minutes (note: si on fait l'extraction de plusieurs pétris simultanément, il faut garder les tubes dans la glace en attendant de les vortexer).

- Centrifuger 15 min. à 1000 tours. Le surnageant est recueilli dans un tube Eppendorff stérile et contient l'ARN cytoplasmique total; on peut congeler la solution à ce stade. Le culot contient les noyaux, il est resuspendu dans 1 ml de tampon RSB et le tout est recueilli dans un tube Eppendorff. On peut congeler la solution à ce stade.

Purification des acides nucléiques

i) ARN

On ajoute à la solution une pincée de SDS, une pincée de protéinase K. On laisse reposer la solution à 37° pendant 1/2 heure.

L'ARN est alors purifié des protéines par la procédure suivante:

- Ajouter 1 volume de Phénol à Ph 6.5 (Phénol: 1 vol. de Phénol, 1 vol. de tampon TE à Ph \approx 6.5; le résultat est une solution en 2 phases; on extrait la phase aqueuse et on la remplace par du tampon TE jusqu'à obtention d'un Ph de \approx 6.5 dans la phase aqueuse. On ajoute également de l'hydroxyquinoline 0.1% (dans la phase phénolée)).

- Vortexer, centrifuger; la solution se sépare en 2 phases: la phase inférieure, contient le phénol et les protéines, la phase supérieure l'ARN.

- Se débarrasser de la phase inférieure.

- Répéter 1 fois avec du phénol, 2 fois avec du phénol chloroforme (solution moitié-moitié), 2 fois avec du chloroforme.

La solution d'ARN est alors recueillie dans un tube d'ultra centrifugeuse stérile, auquel on ajoute 1/10 Vol. de CH₃ COONa 3M stérile et 2 Volumes d'éthanol; le tube est placé au congélateur pour au moins 12 heures (mais l'ARN peut être conservé ainsi pour très longtemps). Après 12 heures, placer le tube dans une ultracentrifugeuse, à 15 000 tours/min. pour

1/2 heure. Se débarrasser du surnageant; le culot est resuspendu dans 30 μ l d'eau distillée (i.e. 30 μ l pour le culot résultant du traitement d'un p \acute etri confluent), et congelé. N.B. le principal piège de la manipulation de l'ARN réside dans l'ubiquité des Rnases, et notamment des Rnases contenues dans divers micro-organismes, ce qui explique les précautions de stérilité au cours de la procédure. De plus, le froid et le VRC inhibent les Rnases.

ii) ADN

Préparer de la solution STOP 10x (EDTA 200 mM ,SDS 5%), ajouter à la suspension de noyaux, qui a un volume de 1 ml, 100 μ l de solution STOP 10x, 50 μ l de STOP 1x, une pincée de protéinase K; laisser incuber 1/2 heure à 37°. L'ADN est alors purifié au phénol selon une procédure similaire à l'ARN, mais avec un phénol à Ph différent (soit 7.6); l'ADN est alors dialysé durant 24 heures, dans du tampon TE (EDTA 1 mM , Tris Cl 10 mM; ajuster au Ph désiré avec HCl), au travers d'une membrane à dialyse (Spectropor) d'un poids moléculaire - seuil de 12 000 daltons.

Evaluation de la concentration des acides nucléiques

On utilise pour ceci un p \acute etri où l'on a coulé de l'agar contenant du bromure d'éthidium (1% Agar (Seakem), 0.5 μ g/ml bromure d'éthidium). Le bromure d'éthidium est un composé qui s'intercale entre les bases des acides nucléiques et

devient alors fluorescent. On dépose donc une petite quantité ($1 \mu\text{l}$) de la solution d'acides nucléiques sur l'agar, ainsi que des solutions-témoin à diverses concentrations; après quelques minutes, le pétri est photographié sous lumière ultraviolette et l'intensité de la fluorescence de la solution peut être comparée à celle des solutions témoins, et ainsi fournir une estimation de la concentration d'acide nucléique.

N.B. l'ARN et l'ADN réagissant avec des intensités différentes avec le bromure d'éthidium, on doit utiliser les témoins appropriés, soient:

i) des solutions d'ADN de thymus de veau (Sigma Chemicals) pour l'ADN.

ii) des solutions d'ARNt de levures (Sigma Chemicals) pour l'ARN.

Fixation de l'ARN sur membranes de nitro-cellulose

Afin d'être hybridé avec une sonde radioactive, l'ARN doit être fixé sur une membrane de nitro-cellulose (Schleider-Schuell). Pour ce faire, $2 \mu\text{l}$ d'ARN sont déposés sur la membrane, qui est alors cuite à 80°C pendant 2 heures.

N.B. l'ARN, étant monocaténaire, n'a pas besoin d'être dénaturé.

Digestion de l'ADN par les enzymes de restriction

La procédure est ici détaillée pour la 2^e série d'expériences.

Pour chaque lignée investiguée, 2 digestions sont faites:

- i) par Hind III seulement
- ii) par Hpa II et Hind III

Comme nous voulons avoir les mêmes quantités d'ADN pour chaque lignée, en dépit de concentrations différentes, un volume contenant la quantité appropriée est mis dans un tube Eppendorff et lyophilisée. On peut alors resuspendre dans de l'eau distillée, ajouter les enzymes de restriction et les tampons appropriés.

i) pour Hind III seulement, on utilise le tampon "M" (NaCl 50 mM , Tris Cl (Ph 7.5) 10 mM, MgCl 10 mM , Dithio-treitol 1 mM).

ii) pour la digestion combinée, on digère d'abord par Hpa II en utilisant le tampon "L" (Tris Cl (Ph 7.5) 10 mM , Mg Cl 10 mM, Dithiotreitol 1 mM), puis on ajoute le tampon "M" et l'enzyme Hind III.

Les enzymes provenaient de Boehringer Chemicals, et furent utilisés à une concentration de 10 u/ μ g d'ADN. La digestion a lieu à 37°C pendant \simeq 12 heures.

Migration sur gel d'agarose

Un gel d'agarose 1.3% (1.3% d'agarose dans du tampon "Raskas": 0.04M Tris acétate, 2 mM EDTA) est préparé, placé dans le bac d'électrophorèse, qui est rempli de tampon Raskas. On ajoute à la solution d'ADN un colorant ("loading dye": bleu de bromophénol 0.25%, xylène cyanoll 0.25%, ficoll 15%), 1 partie dans 5, et la solution est placée dans le puit approprié. L'électrophorèse se fait à 20 volts, durant 12 heures. Le gel est alors placé dans une solution de bromure d'éthidium ($\approx 1 \mu\text{g/ml}$) pendant 15 minutes, puis photographié sous lumière ultraviolette.

Transfert de l'ADN sur membrane de nitro-cellulose ("Southern-Blot")

Le gel est d'abord placé dans une solution de NaOH 0.5N NaCl 1M, pour 15 minutes, avec agitation; on répète le processus 1 fois. Ceci dénature l'ADN contenu dans le gel.

Le gel est alors placé dans une solution de neutralisation (Tris 0.5 M, NaCl 1.5 M) pour 1/2 heure, avec agitation. La membrane de nitro-cellulose est trempée 1 minute dans de l'eau distillée, puis au moins 5 minutes dans une solution de SSC 20x (NaCl 3 M, citrate de sodium 0.3 M). On peut alors procéder au transfert proprement dit. (cf. figure 4)

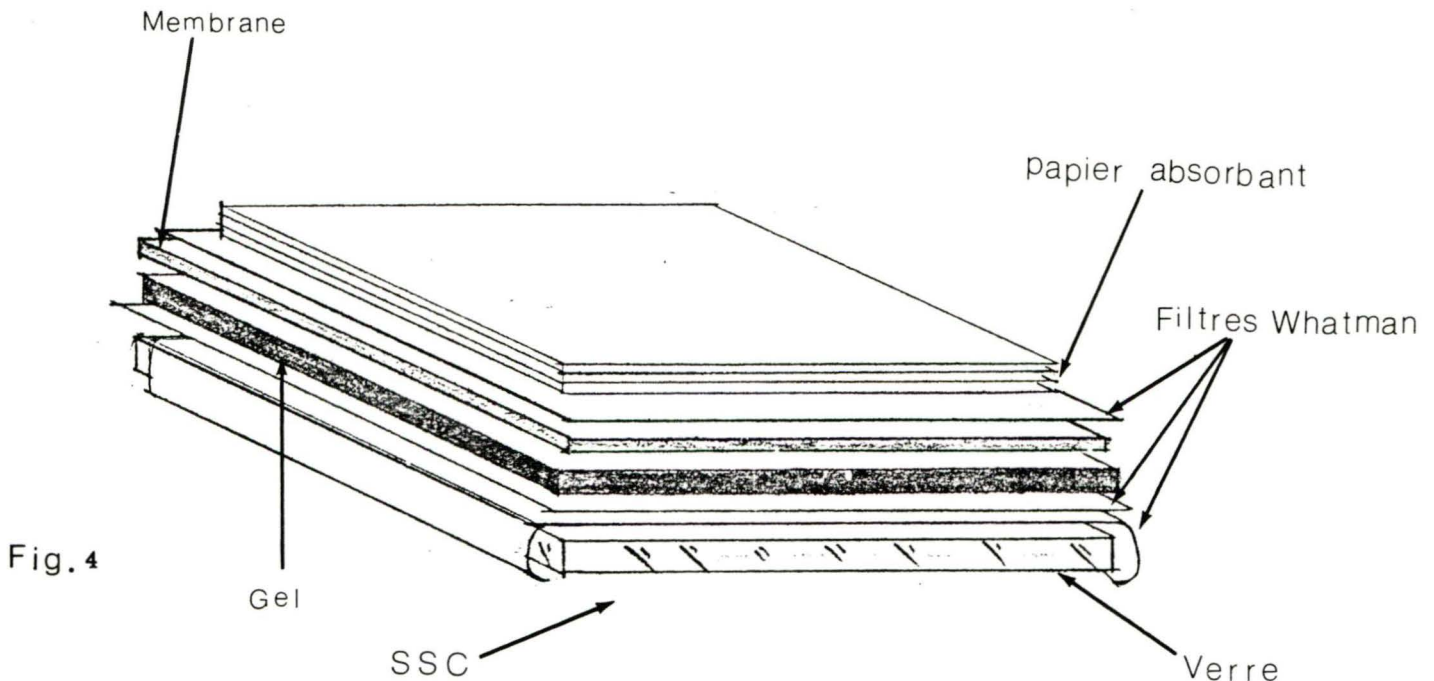


Fig. 4

Le papier absorbant induit un "courant" de tampon SSC qui, passant au travers du gel, transporte l'ADN vers la membrane de nitro-cellulose, dans les mailles de laquelle il est arrêté.

Le transfert se produit pendant 4 heures, puis la membrane est retirée et cuite au four à 80°C pendant 2 heures.

Préparation des sondes

Une sonde est un fragment d'ADN radioactif (i.e. marqué au ^{32}P) contenant une région monocaténaire susceptible de s'hybrider avec un fragment d'ADN complémentaire.

Deux types de sondes furent utilisées dans cette expérience:

i) des sondes préparées par "nick-translation" à partir d'ADN bicaténaire.

ii) des sondes préparées par complémentation partielle à partir d'ADN monocaténaire.

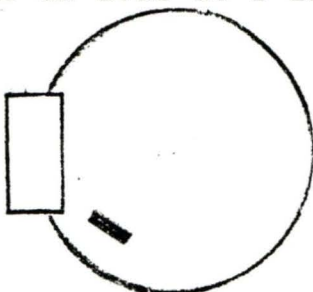
i) cette méthode consiste à incuber l'ADN avec de la Dnase, qui introduit des "nick" dans l'ADN, et de la DNA polymérase (Kornberg type I, Beohringer) qui répare l'ADN; tout ceci ayant lieu en présence de nucléotides radioactifs, la réparation incorpore donc ces nucléotides radioactifs dans l'ADN.

3 sondes furent utilisées: le fragment Hind III i de l'adénovirus 2 cloné dans PBR - 322, pour la région L1; le fragment Bgl II e cloné dans PBR - 322 pour la région E1; le fragment Hind III c cloné dans PBR - 322 pour la région du promoteur (situé à 16.5). Le lecteur peut se référer à la figure 3 pour visualiser l'utilisation de ces fragments comme sondes.

Pour réaliser la sonde, on utilise la recette suivante: 0.1 μ g d'ADN, 1 u de DNA polymérase (Kornberg type I), 2 μ l de dGTP, dTTP à une concentration de 0.025 mM, 50 μ Curies de dCTP (Amersham), 50 μ curies de dATP (Amersham), 1 μ l de Dnase I (0.01 μ g/ml), 2 μ l de tampon NTB 10x (Tris Cl 0.5 M (Ph 7.2), Mg SO₄ 0.1 M, dithiotreitol 1 mM, BSA 500 μ g/ml). On complète le volume à 20 μ l, on incube à 14°C pendant 1 heure. L'ADN marqué est alors séparé des nucléotides "chauds" libres par élution sur colonne de séphadex, et la sonde ainsi obtenue doit être dénaturée avant usage par incubation à 100° pendant 15 min. suivi d'une mise sur glace pendant 10 min.

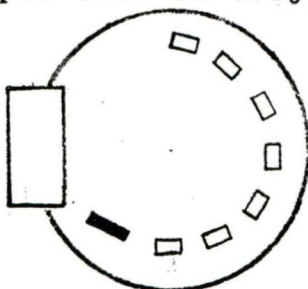
ii) On utilise pour ceci un fragment d'ADN cloné dans le phage M-13, dont le génome est monocaténaire. On hybride l'ADN monocaténaire du phage avec un "primer" dit "hybridization primer", situé en aval de l'insertion:

Fig.5



Puis on incube cet hybride en présence de DNA polymérase (fragment Klenow de la polymérase Kornberg type I, Boehringer Chemicals) et de nucléotides radioactifs; un temps d'incubation judicieusement choisi fait en sorte que la polymérase n'accomplisse pas tout le trajet:

Fig.6



Ainsi la région de l'insertion est monocaténaire, le brin nouvellement formé est radioactif. Nous avons utilisé le fragment 29.3 - 31.7, cloné dans M-13; ce fragment s'inscrit donc dans la région L1 (cf. fig. 3).

Nous avons suivi le protocole suivant:

a) hybridation:

10 μ l de solution d'ADN (à une concentration entre 0.1 mg/ml et 0.01 mg/ml.

2 μ l de primer d'hybridation (PL biochemical), 1.5 μ l Tris MgCl (Tris 100 mM, MgCl 50 mM). Incuber 5 min. à 95°C;

laisser refroidir lentement à la température de la pièce.

b) incorporation des nucléotides radioactifs:

0.1 μg d'ADN hybridé selon a), dans 5 μl d'eau distillée.

2 μl de chacun des déoxynucléotides à une concentration de 0.025 mM (N.B. les 4 doivent être présents)

50 μcuries de dATP, 50 μcuries de dCTP, 1 μl dTT 0.1M.

Volume total: 20 μl . Incuber 60 min. à 15°C. La sonde est alors séparée des nucléotides chauds par élution sur colonne de séphadex; la sonde est prête à servir: avec ce type de sonde on ne doit pas dénaturer.

Hybridation

La membrane de nitro-cellulose est placée dans un sac de plastique scellé en présence d'une solution de pré-hybridation (dans 40 ml de cette solution, on a: formamide 20 ml, SSC 20x 10 ml, tampon phosphate 4 ml (0.5 M, Ph 6.5), glycine 0.4g, Solution de Denhardt 2 ml (Ficoll 0.02%, PVP 0.02%, BSA 0.02%)), 4 ml d'ADN de thymus de veau dénaturé (2.5 mg/ml)), et incubé 2 heures à 42°C avec agitation. Le sac est ouvert, la solution retirée et remplacée par une solution d'hybridation (dans 42 ml on a: formamide 20 ml, SSC 20x 10 ml, Denhardt 0.4 ml, tampon phosphate 1.6ml, ADN de thymus de veau dénaturé 1.6 ml, SDS 10% 400 μl , dextran sulfate 8 ml (ce 8 ml contenant 4 g. de dextran sulfate)) à laquelle on ajoute la sonde. Le sac est

scellé et on incube à 42°C pour au moins 12 heures.

N.B. une membrane ayant déjà subi l'hybridation peut être utilisée à nouveau selon ce protocole, pourvu qu'il soit précédé d'un "lavage" de la membrane: la membrane est scellée en présence de solution de pré-hybridation, incubé 1/2 heure à 65°C avec agitation, répéter 1 fois.

Lavage de la membrane et exposition

Lorsque l'hybridation est terminée, on retire la solution. La membrane est alors extraite et placée dans une solution de lavage (100 ml de SSC 20x, 10 ml SDS 10% compléter à 1l) et lavée avec agitation pendant 5 min. La procédure est répétée 2 fois. (N.B. les liquides radioactifs doivent être éliminés de façon appropriée). Puis la membrane est placée dans une nouvelle solution de lavage (50 ml de la solution ci-haut, 10 ml SDS 10%, compléter à 1l) et lavée avec agitation à 42°C pendant 1/2 heure; la procédure est répétée 1 fois.

Finalement la membrane est déposée sur papier filtre (Whatman) et séchée sous la lampe, puis entourée d'un "Saran Wrap" et placé dans une cassette de films avec un film à radiographie (Kodak); le film est en "sandwich" entre la membrane et un écran "lightning plus" émettant des photons lors que frappé par les rayons du ^{32}P (Naturellement le chargement de la cassette se fait à la chambre noire).

La cassette est alors remise à -70° pour un temps d'exposition adéquat (qui dans ce travail, a varié entre 4 jours et 2 semaines) et développé. (référence: Maniatis et al.)

RESULTATS

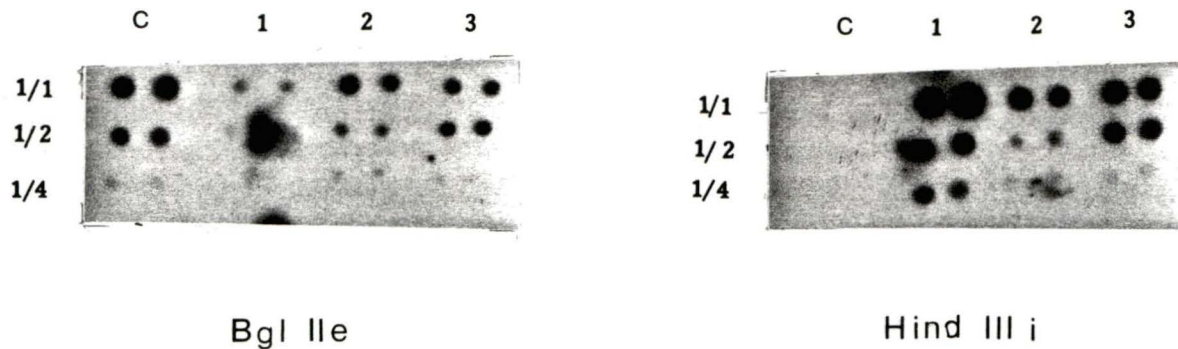
Les résultats décrits dans cette section s'articulent autour de 2 séries d'expériences: dans la 1ère série, des cellules F-4 furent cultivées "en vrac", en présence d'azacytidine, afin de provoquer, si possible, une induction de la région L 1. Dans une 2è série d'expérience, des cellules traitées pendant 30 jours à la 5 - azacytidine furent "sib-clonées" en l'absence de 5 - azacytidine, puis cultivées en l'absence de 5-azacytidine, afin d'isoler une "lignée" (en fait, une population oligo-clonale) présentant une induction stable de la région L 1.

Dans les 2 séries d'expérience, les acides nucléiques furent extraits; l'ARN, afin de vérifier par hybridation avec les sondes appropriées s'il y a eu ou non expression de L 1 (précisons que, de par la méthode utilisée, il s'agit de l'ARN cytoplasmique total, et non pas seulement de l'ARNm); l'ADN, afin de vérifier l'état de la méthylation au moyen de la digestion par Hpa II.

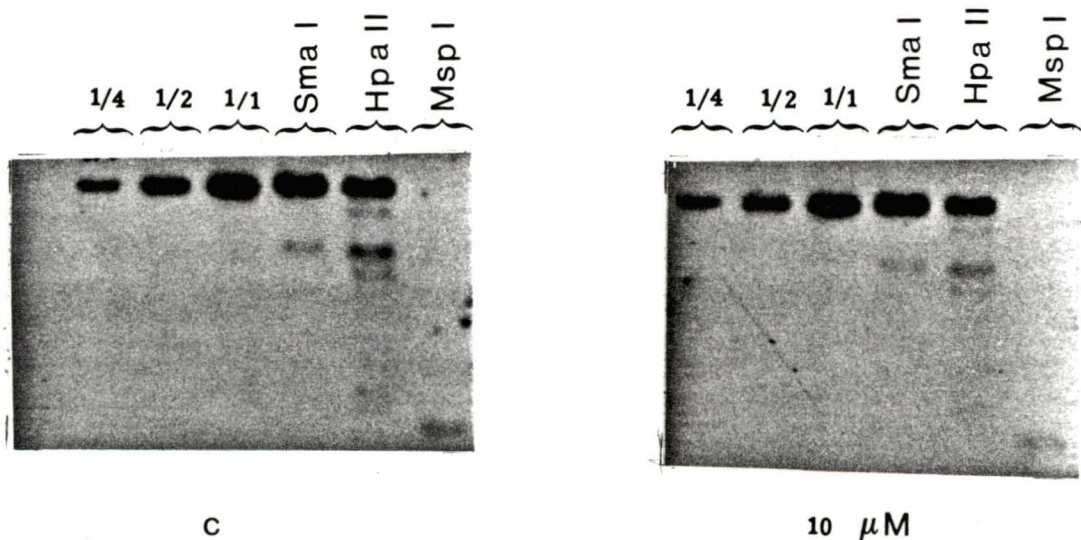
La figure 7 a) montre le résultat d'une expérience où des cellules F-4 furent incubées 2 jours en présence de 5 - azacytidine, puis incubées sans azacytidine pendant 1, 2 ou 3 jours, respectivement. A des concentrations similaires d'ARN, on constate qu'il y a eu induction de la région tardive, comme le démontre l'hybridation avec la sonde Hind III i (N.B. au cours de cette section, ainsi que de la discussion,

Figure 7

Induction de la région L 1



- 7 a) ARN extrait de cellules F - 4 parentales ("C") et de cellules traitées à la 5 - azacytidine ($10 \mu\text{M}$), dont l'ARN a été extrait 1, 2 et 3 jours, respectivement, après le traitement. Ces ARN ont été hybridés avec les sondes Hind III i et Bgl II e; les 3 rangées représentent des dilutions de 1/1, 1/2 et 1/4.



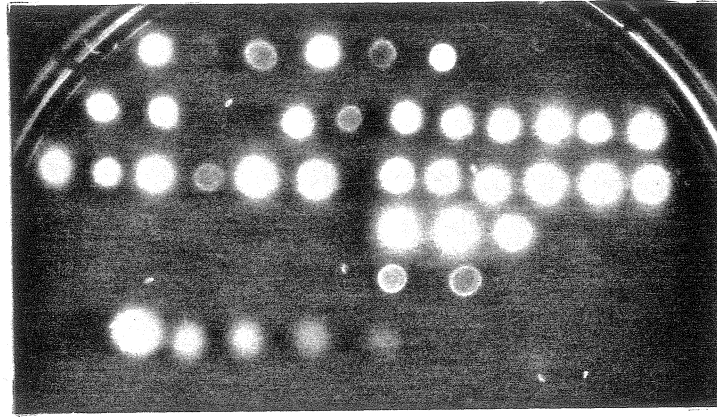
- 7 b) L'ADN de cellules F-4 parentales ("C") et de cellules traitées à la 5 - azacytidine ($10 \mu\text{M}$) a été digéré avec différents enzymes de restriction, migré sur gel, transféré sur membrane de nitro-cellulose et hybridé avec la sonde Hind III i; dans tous les cas, l'ADN a été d'abord digéré avec Hind III; selon les puits, soit il n'y a pas eu de seconde digestion, soit il y a eu digestion par l'enzyme indiqué.

le lecteur peut se référer à la figure 3 pour situer les sondes par rapport au génome de l'adénovirus), mais cette induction est transitoire et diminue avec le temps; parallèlement à ceci, on notera qu'il semble y avoir eu une diminution de l'expression de la région E 1 (hybridation avec Bgl II e). Notons que ces résultats furent obtenus, à 7 reprises au cours d'expériences indépendantes (résultats non montrés). La figure 7 b) démontre i) la présence d'une méthylation de la région codante de L 1 (comme le démontre la différence de digestion entre Hpa II et Msp I) et ii) l'absence d'hypométhylation détectable dans la région codante après incubation avec la 5 - azacytidine.

Afin de vérifier si une induction stable était possible, des cellules F-4 ont été incubées 30 jours en présence de 5 - azacytidine, puis sib-clonées et cultivées en l'absence de 5 - azacytidine. La figure 8 montre les ARN des différents sib-clones (ci-après désignés clones) tels que visualisés sur l'agar au bromure d'éthidium; cette figure fournit également une estimation semi-quantitative de la concentration des ARN. De plus, afin de démontrer l'absence de contamination de l'ARN par de l'ADN avec la procédure utilisée, 1 μ l d'ARN extrait de cellules F-4 parentales selon la méthode précédemment décrite, a été mis dans une solution contenant de la Dnase (0.05 g/ml) et de la Rnasine; après incubation, 1 μ l de cette solution est placé sur l'agar au bromure d'éthidium, à côté d'un μ l d'ARN de cellules F-4 non digéré, dilué à la même concentration que la solution avec la Dnase. Ainsi que le montre la figure 8,

Figure 8

ARN extrait des clones



49 38 28 20 8 2

75 50 14 13 9 7 36 35 11 12 6 23

b)

69 32 65 63 61 51 72 19 70 46 25 30

71 24 C

c/20 c-Dnase

mg/ml: 1.0 0.5 0.25 0.125 0.0625

La figure 8 a) montre la photo à l'ultraviolet de solutions d'ARN de diverses provenances déposées sur un gel d'agarose au bromure d'ethidium pour fins de coloration. La figure 8 b) indique, aux endroits correspondants, la provenance des ARN selon le code suivant:

C = ARN de F 4 parental
 nombre = nombre identificateur du clone
 C/20 = ARN de F-4 parental dilué 20 fois.
 C - Dnase = ARN de F 4 dilué 20 fois et incubé avec Dnase et Rnasine
 mg/ml = solutions témoins d'ARN de levure aux concentrations indiquées

les 2 taches sont de même intensité, excluant la présence d'ADN.

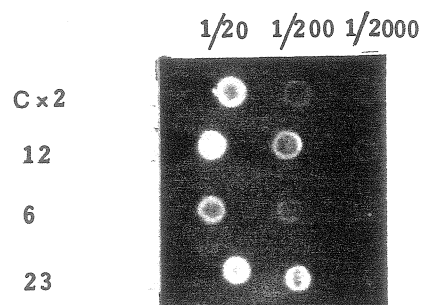
Tous les ARN extraits des clones ont été hybridés avec la sonde Bgl II e afin de comparer l'activité de transcription du gène E 1 entre les clones et les cellules parentales. L'intensité des taches est très bien corrélée avec la concentration des solutions d'ARN (résultats non montrés), à l'exception des clones 6, 12 et 23, tel qu'illustré par la figure 9 b); la figure 9 a) démontre également que cet effet ne peut s'expliquer simplement par une différence de concentration. Le clone 71 a également montré ce phénomène (résultat non montré).

Par la suite, les clones furent hybridés avec la sonde Hind III i, permettant ainsi d'évaluer la transcription du gène L 1; la figure 10 montre que le gène L 1 est transcrit chez les clones 6, 12, 71, 30, 25, 46, 70. De plus, ainsi que nous le verrons plus loin, le clone 23 a eu une légère induction, inapparente sur la figure 10 à cause d'une exposition trop courte.

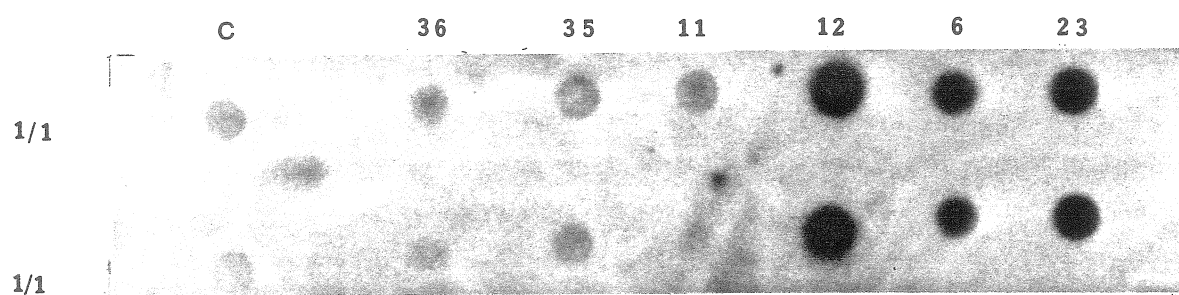
Une 2^e hybridation a été réalisée, sur un filtre différent, afin de corroborer ces résultats; la sonde utilisée était le fragment 29.3 - 31.7 cloné dans M-13 (brin r), qui permet de sonder la transcription de la région L 1 (cf. fig. 3). De plus, cette sonde simple brin permet de déduire la parité de l'ARN transcrit. Cette hybridation est illustrée à la figure 11. L'hybridation avec le brin opposé (brin l) était négative (résultat non montré).

Figure 9

Expression augmentée de E 1



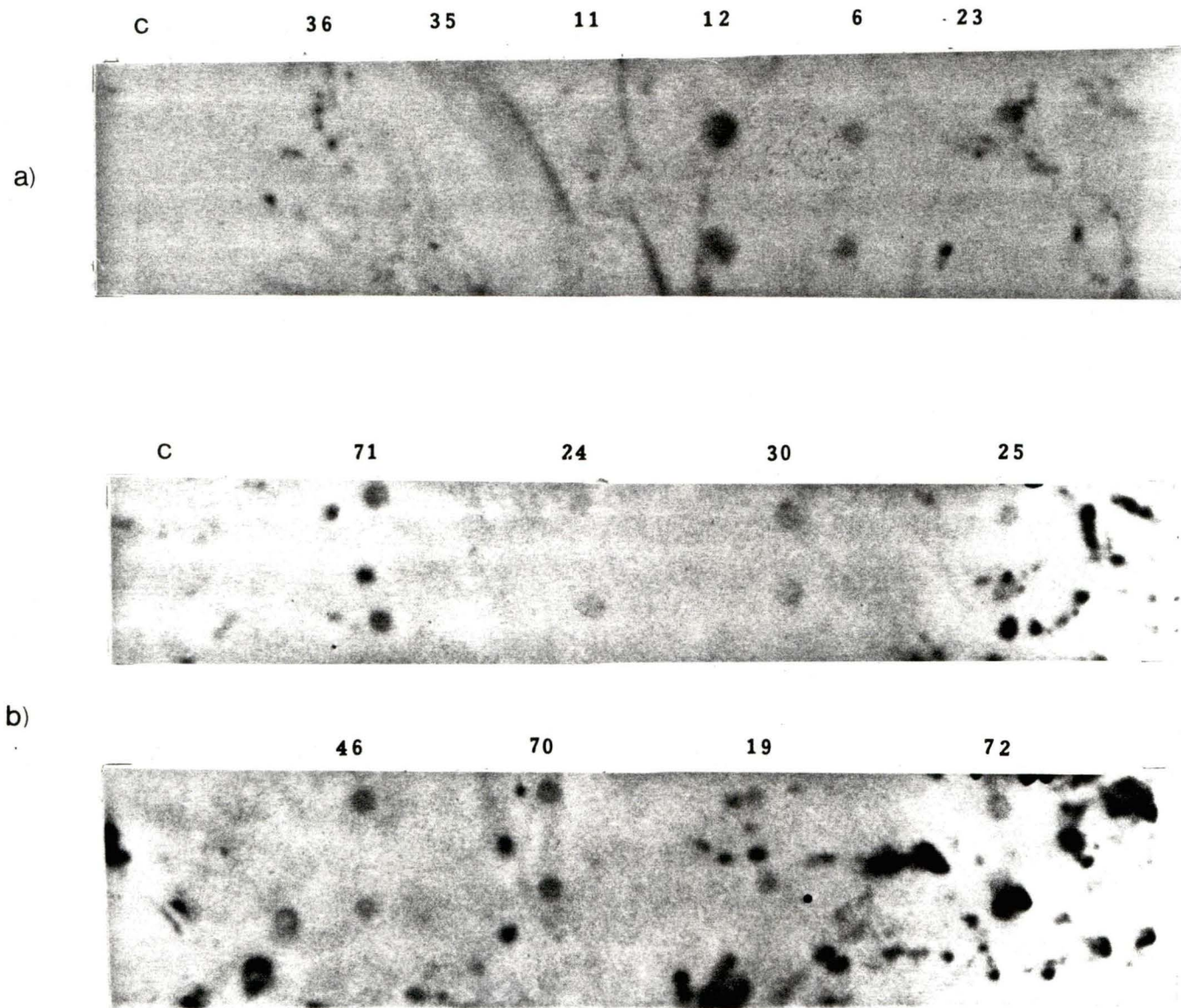
9 a) Diverses dilutions de solutions d'ARN provenant des clones indiquées. C = ARN de cellules F-4 parentales.



9 b) Hybridation d'ARN de quelques clones avec la sonde Bgl II e.

Figure 10

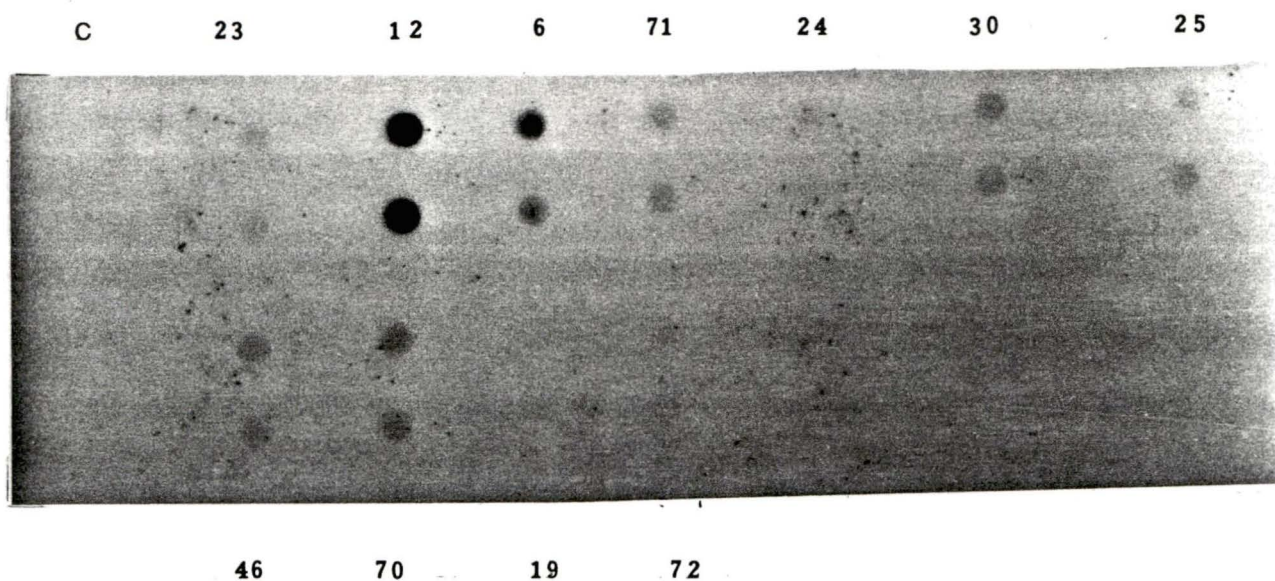
Induction de l'expression de L 1 chez certains clones



10 a) et 10 b) Hybridation de l'ARN provenant des clones indiqués avec la sonde Hind III i.

Figure 11

Parité de l'induction



- 11) Les clones L 1 + sont hybridés avec un fragment (29.3 - 31.7) cloné dans M - 13 (brin r) et mettent donc en évidence la transcription du brin r.

Afin de savoir si ces résultats pouvaient être obtenus par clonage, sans traitement à la 5 - azacytidine, des cellules F-4 parentales furent clonées en l'absence de 5 - azacytidine, et les ARN extraits et hybridés. La figure 12 démontre une absence de transcription de L 1 chez ces clones.

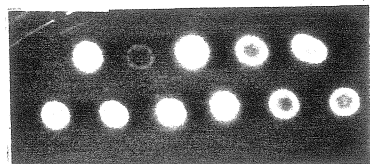
Nous pouvons donc résumer en un tableau les résultats obtenus jusqu'à présent:

Sib clone #	nombre de clones	concentration de l'ARN	E l	L l
6	2	1.0	++	++
12	3	2.0	++++	+++
23	2	1.0	+++	+
71	16	2.0	+++	+
30	11	2.0	+	+
25	2	2.0	+	+
46	9	1.0	+	+
70	18	1.0	+	+
F-4	-	1.0	+	-
24 autres clones	-	-	+	-

N.B. Tous les clones ci-hauts ont été obtenus à partir de cellules F-4 exposées 30 jours à la 5 - azacytidine.

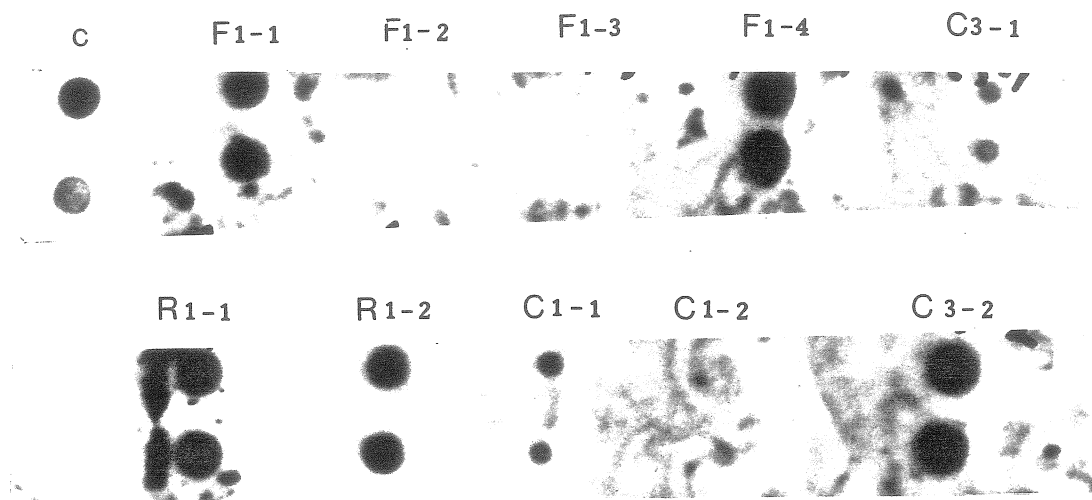
Figure 12

Clonage simple, sans traitement

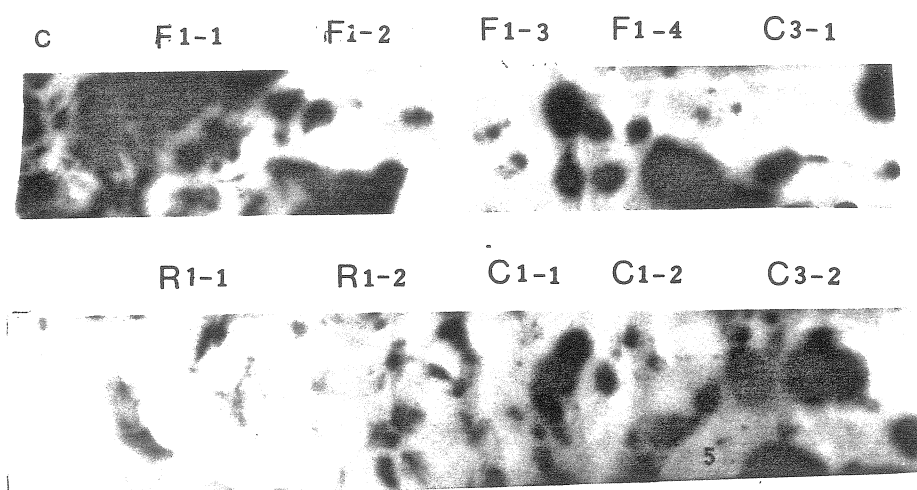


F1-1 F1-2 F1-3 F1-4 C3-1
R1-1 R1-2 C1-1 C1-2 C3-2 c

12 a) Concentration de l'ARN des clones non traités.



12 b) Hybridation des clones ci-haut avec la sonde Bgl II e



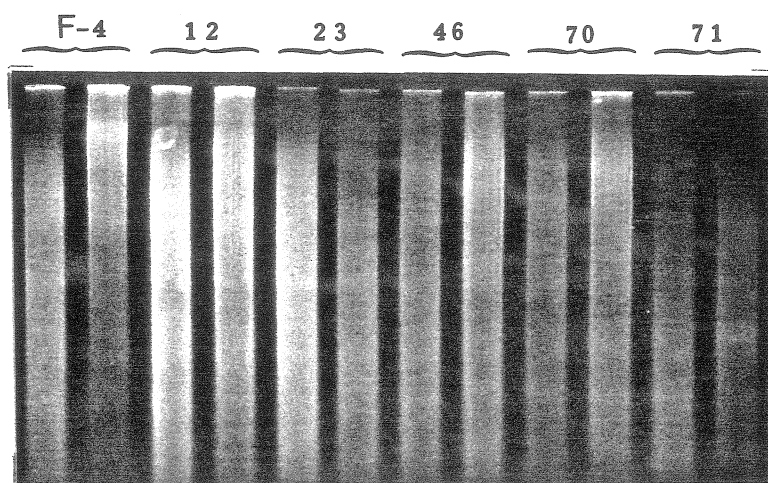
12 c) Hybridation de l'ARN des clones ci-haut avec la sonde Hind III i (le "bruit de fond" témoigne de la longueur de l'exposition).

Afin de vérifier l'état de la méthylation chez les clones induits, l'ADN des clones 12, 23, 46, 70 et 71 a été digéré par Hind III, puis par Hpa II. Cet ADN a ensuite été soumis à l'électrophorèse et hybridé. Comme l'illustre la figure 13 a) les puits contenaient des quantités égales d'ADN ($\simeq 4 \mu\text{g}$) sauf pour le clone 71 ($\simeq 1.25 \mu\text{g}$; il y avait moins d'ADN disponible). Pour chaque clone, la 1ère colonne contient de l'ADN digéré par Hind III et Hpa II, la 2è colonne par Hind III seulement. L'hybridation est illustrée dans la figure 13 b). Comme on le voit, la digestion par Hind III n'a pas bien fonctionné dans la 2è colonne de l'ADN de F-4, mais cependant une comparaison des colonnes Hpa II ne permet pas de mettre en évidence des différences, et par conséquent il n'y a pas, dans la région codante, de différences de méthylation chez les clones induits par rapport aux cellules parentales.

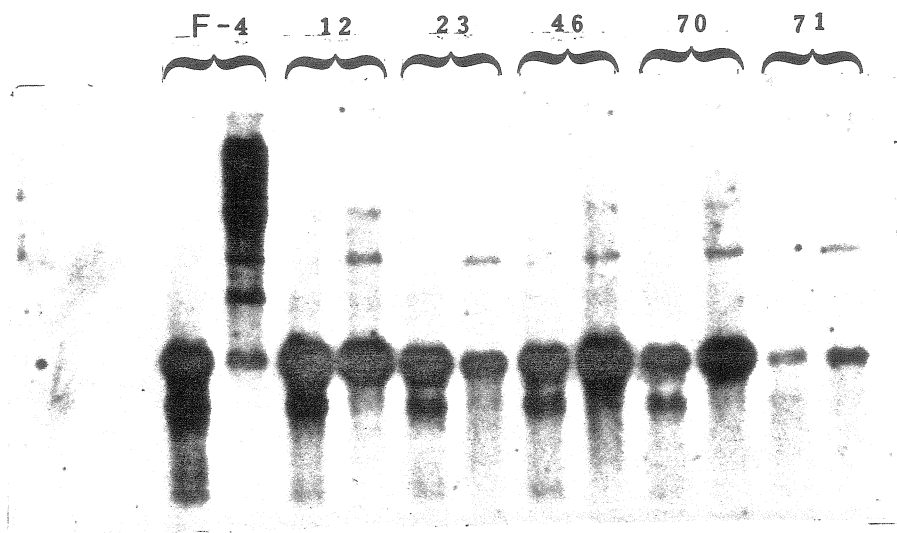
Cette même membrane a été hybridée avec la sonde Hind III c, qui contient le promoteur de L 1; là encore, on ne met en évidence aucune différence de méthylation (figure 14).

Figure 13

Méthylation de la région codante de L 1



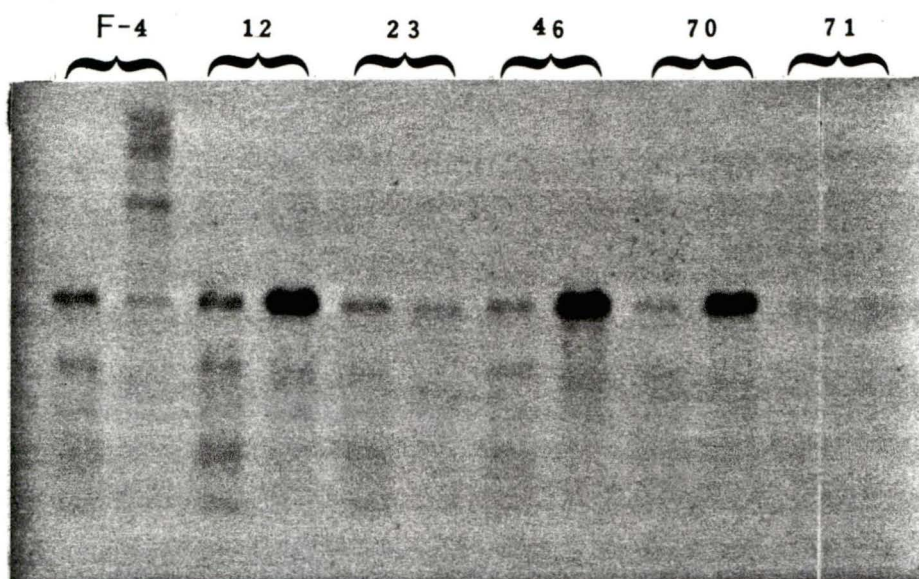
13 a) Photo à l'ultraviolet du gel de migration de l'ADN extrait des clones indiqués; pour chaque clone le 1er puit contient l'ADN digéré par Hind III et Hpa II, le 2è puit contient l'ADN digéré par Hind III seulement.



13 b) Hybridation de l'ADN transféré sur membrane de nitrocellulose avec la sonde Hind III i.

Figure 14

Méthylation de la région du promoteur



- 14) Hybridation de la même membrane que dans la figure 13 b) mais avec la sonde Hind III c.

DISCUSSION

Nous sommes maintenant en mesure de répondre aux 2 questions soulevées à la fin de l'introduction:

1) l'induction des gènes L 1 est certainement possible, telle que confirmée par la figure 7 a).

2) l'induction stable des gènes L 1 est également possible, comme le démontrent les figures 10 et 11.

Le résultat de la figure 11, confirmant que l'ARN est bel et bien transcrit à partir du brin r, nous permet d'affirmer que c'est la région L 1 qui est transcrite. En effet chez l'adénovirus les 2 brins de l'ADN contiennent des gènes; bien que le consensus actuel soit à l'effet que la région L 1 ne chevauche pas la région codante du gène E 2 b, transcrit à partir du brin l (cf. par exemple Lewis et Matthews 1981), la littérature porte encore la trace de la confusion qui a existé un temps à ce sujet (cf. par exemple Tooze 1981, p. 746 b). Par ailleurs, il eut été surprenant que la région E 2 b fut transcrite, étant donné le fait que le promoteur E 2 ne figure pas parmi les régions du génome de l'adénovirus 2 intégrées dans les chromosomes des cellules F-4.

Le fait qu'il faille procéder au clonage pour mettre en évidence la stabilité de l'induction de L 1 nous permet de conclure que vraisemblablement le caractère transitoire de l'expression de L 1 chez la population non clonée est dû à une "dilution" des cellules induites au sein de la population

générale; il s'ensuit donc que l'induction de L 1, soit est défavorable à la cellule (i.e. présence d'un facteur jouant contre la sélection de ces cellules), soit ne confère aucun avantage à la cellule (i.e. absence de facteur sélectionnant ces cellules). Une situation somme toute analogue à la "dilution" au sein de la population générale de bactéries résistantes à un antibiotique, lorsque la culture est faite en l'absence de cet antibiotique.

La figure 12 montre que les résultats obtenus avec un traitement à l'azacytidine n'ont pu être obtenus avec un simple clonage de cellules; naturellement cette simple expérience n'exclut pas la possibilité d'une induction de L 1 par clonage, mais semble indiquer que la fréquence en est plus faible qu'avec un traitement à la 5 - azacytidine; rappelons de plus que l'hybridation positive des ARN avec Hind III i est sans précédent dans la littérature (Lewis et Matthews 1981). Spécifiquement, la figure 12 montre que, bien qu'il y ait effectivement de l'ARN et que la région E 1 soit exprimée presque partout, la région L 1 n'est exprimée dans aucune lignée, en bon accord avec la littérature.

Il reste à élucider le mécanisme par lequel cette induction a été accomplie. Les figures 7 b) et 13 b) démontrent que l'induction de la transcription de L 1 n'est pas accompagnée, à un niveau détectable par la méthode utilisée, d'hypométhylation de la région codante. Or, la figure 7 b) démontre la présence de sites CCGG puisqu'il y a eu digestion par MspI. Ceci est en bon accord avec d'autres travaux (Kruczek et al.,

1983; Langmer et al., 1984) qui établissent que c'est la méthylation de la région en amont du promoteur qui affecte la transcription. Le promoteur de la région L 1 est le "major-late promoter", situé environ à 16.3 - 16.4 du génome. La figure 14 montre le résultat d'une hybridation avec le fragment Hind III c (7.7 - 17.1); cette expérience ne démontre pas d'hypométhylation dans la région du promoteur. Cependant ce dernier résultat n'est guère concluant car i) la sonde, étant un large fragment, n'est pas vraiment spécifique à la région du promoteur ii) un examen de la séquence de l'adénovirus montre, si on regarde les 200 paires de bases en amont du promoteur, une absence de site CCGG (bien qu'il y ait de nombreux sites CG) (séquence: cf. Gingeras et al., 1982). Ainsi une hypométhylation n'aurait pu être démontrée par la digestion par Hpa II.

Enfin, il convient à ce stade de la discussion de rappeler les résultats obtenus par Tamame et al., (Tamame et al., 1983 (1); Tamame et al., 1983 (2)): ces travaux établissent l'induction consistante d'un phénotype stable par traitement à la 5 - azacytidine chez *Aspergillus*, sans que la méthylation de l'ADN semble en cause (Le génome d'*Aspergillus* ne contient pas à des niveaux détectables de 5 - méthyl cytosine).

CONCLUSIONS

1) Un traitement à la 5 - azacytidine est capable d'altérer l'expression, au niveau de la transcription, de la fraction du génome d'adénovirus type 2 intégré dans les cellules de rat F-4.

2) En particulier on peut induire l'expression de la région L 1, qui normalement n'est pas exprimée dans les cellules F-4. De plus on démontre que cette induction est stable.

3) Ce résultat n'a pu être reproduit par simple clonage sans traitement à la 5 - azacytidine.

4) Cette induction n'est pas accompagnée d'une hypométhylation de la région codante.

BIBLIOGRAPHIE

- BIRD, Adrian P. "DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA", *Nucleic Acids Research*. Vol. 8 No. 7, p. 1499-1504. 1980.
- BRIERE, Normand. "Unmasking of proteins by in vitro methylation of rat lines RNA during AZO dye carcinogenesis", *Stain technology*. Vol. 46 no. 4 p. 201-205. 1971.
- DOERFLER, Walter. "Uptake, fixation and expression of foreign DNA in mammalian cells: the organisation of integrated Adenovirus DNA sequences". *Current topics in Microbiology and Immunology* 101: 127-194. 1982 (1).
- DOERFLER, Walter. "In search of more complex genetic codes - can linguistics be a guide?" *Med. Hypothesis* 9: 563-579. 1982 (2).
- DOERFLER, Walter. "DNA methylation and genes activity", *Ann. Rev. Biochem* 52; p. 93-124. 1983.
- GAMA-LOSA, MIGUEL, A. SLAGEL, VALERO, A. TREWYN, W. Ronald, OXENHANDLER, Ronald, KUO, Kenneth C., GEHRKE, Charles W. ERLICH, Melanie. "The 5 - methyl cytosine content of DNA from human tumors, *Nucleic Acids research*. Vol. 11 no. 19, p. 6883-6894. 1983.
- GINGERAS, T.R., SCIAKY, D., GELINAS, R.E., BING DONG, J. YEN, C.E., KELLY, M.M., BULLOCK, P.A., PARSONS, B.L., O'NEILL, K.E., ROBERTS, R.J. "Nucleotide sequence from the adenovirus 2 genome". *J. of Biol. Chem.* Vol. 257, no. 22, p. 13475-13491. 1982.
- GOELZ, Susan, VOGELSTEIN, Bert; HAMILTON, Stanley R.; FEINBERG Andrew P. "Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasm". *Science*. Vol. 228. p. 187-190. 1985.
- HARRISON, Janie J.; ANISOWICZ, Anthony; GADI, Inder C.; RAFFELD, Mark; SAGER, Ruth; "Azacytidine induced tumorigenesis of CHEF 118 cells: correlated DNA methylation and chromosome changes". *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 80. p. 6606-6610. 1983.
- HOFFMAN, Robert; "Altered methionine metabolism, DNA methylation and oncogene expression in carcinogenesis", *Biochemica et Biophysica Acta*, 738, p. 49-87. 1984.

- JONES, Peter A.; TAYLOR, Shirley M. "Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation". *Cell*. 20: p. 85-93. 1980.
- JOVE, Richard; Sperker, David E.; Manley, James L. "Transcription of methylated eukaryotic viral genes in a soluble in vitro system". *Nucleic acids research*. Vol. 12 no. 11, 1984. p. 4715-4730.
- KRUCZEK, Inge; DOERFLER, Walter: "Expression of the chloramphenicol acetyl transferase gene in mammalian cells under the control of adenovirus type 12 promoter: effect of promoter methylation on gene expression" *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 80 p. 7586-7590. 1983.
- LANGMER, Klaus Dieter; VARDIMON, Lily; RENY, Doris; DOERFLER, Walter: "DNA methylation of the 5'CCG3' sites in the promoter and 5' region inactivate the E2a gene of adenovirus type 2", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81 p. 2950-2954. 1984.
- LEWIS, James B; MATHEWS, Michael B.; "Viral messengers RNA in six lines of adenovirus transformed cells: *Virology* 115 345-360. 1981.
- LEY, Timothy J.; DE SIMONE, Y. ANAGNOU, Nicholas P.; KELLER, George H.; HUMPHRIES, Keith R.; TURNER, Patricia H.; YOUNG, Neal S.; HELLER, Paul; NIENHUIS, Arthur W.; "5-azacytidine selectively increases globin synthesis in a patient with β thalassemia", *New England Journal of Medicine*, Vol. 307, no. 24, p. 1469-1475. Dec.; 1982.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROCK, J. "Molecular cloning a laboratory manual". Cold Spring Harbor. 1982.
- MAX, Edward E. "New twist to DNA methylation". *Nature*. Vol. 310, p. 100, 12 juillet 1984.
- MORGENEGG, Gopf; CELIO, Borio R.; MALFOY, Bernard; LENG, Marc KUENZLE, Cline C. "Z-DNA immunoreactivity in rat tissues" *Nature*. Vol. 303, 9, p. 540-543, Juin 1983.
- RIGGS, Arthur D. "5-methylcytosine, gene regulation and cancer" *Adv. in Cancer Research*. Vol. 40, p. 1-30. 1983.
- SAUER, Gerhard; AMTMANN, Eberhard; KNAPP, Anita; MILLER, Karin. "Reversion of the transformed phenotype of BPV-1 transformed hamster cells by an antiviral xanthate compound", *Abstracts XV Meetings of the European Tumour Virus Group*, Urbino, Italy, p. 90, 19 - 24 september 1984.

- TAMAME, Mercedes; ANTEHUERA, Francisco; VILLANUEVA, Julio R.; SANTOS, Tomas. "5 - azacytidine induces heritable biochemical and developmental changes in the fungus *Aspergillus niger*". J. of gen. microbiol 129. p. 2585-2594, 1983 (1).
- TAMAME, Mercedes; ANTEGUERA, Francisco; VILLANUEVA, Julio R.; SANTOS, Tomas; "High frequency conversion to a "fluffy" developmental phenotype in *Aspergillus* spp. by 5 - azacytidine treatment: evidence for involvement of a single nuclear gene". Molecular and cellular biology, p. 2287-2297. Déc. 1983 (2).
- TOOZE, John, ed. "Molecular Biology of tumour Virus". Cold Spring, Harbor 1982.
- WARDIMON, S.; NEUMANN, R.; KUHLMAN, I.; SULTER, D.; DOERFLER, W.; DNA methylation and viral genes expression in adenovirus transformed and infected cells" Nucleic Acids research, Vol. 8 no. 11, 1980. p. 2461-2473.
- WETTSTEIN, Felix O.; STEVENS, Jack J.; "Shope papiloma Virus DNA is extensively methylated in non virus producing neoplasms" Virology 120, 493-504. 1983.